

***Fusarium sambucinum* Fuckel causal agent of fruit rot of manzano chilli pepper (*Capsicum pubescens*) in Mexico**

***Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México**

Alejandra Almaraz Sánchez¹, Victoria Ayala Escobar¹, Ibar Felipe Tlatilpa Santamaría¹, Daniel Nieto Angel*. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 56230, México. *Autor para correspondencia: dnieto@colpos.mx.

Recibido: 02 de Octubre, 2018.

Aceptado: 12 de Diciembre, 2018.

Almaraz-Sánchez A, Ayala-Escobar V, Tlatilpa-Santamaría IF and Nieto-Angel D. 2018. *Fusarium sambucinum* Fuckel causal agent of fruit rot of manzano chilli pepper (*Capsicum pubescens*) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-2

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

Resumen. El chile manzano al igual que otros frutos, es afectado por patógenos postcosecha que afectan la calidad. En el 2016 se observaron lesiones hundidas con micelio blanquecino en frutos de chile manzano procedentes del Estado de México. El objetivo fue identificar al agente causal del síntoma descrito en frutos, mediante la caracterización morfológica, molecular y pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos con herida y sin herida, así como la caracterización morfológica y molecular. Los resultados indican que el agente causal de los síntomas del hundimiento fue *Fusarium sambucinum*. Los aislados

Abstract. Manzano pepper, like other fruits, is affected by postharvest pathogens that affect quality. In 2016, sunken lesions with whitish mycelium were observed in manzano pepper of samples from the Estado de Mexico. The objective was to identify the causal agent of the symptom described in fruits, by measurements of the morphological, molecular characterization, and pathogenicity tests. Pathogenicity tests were performed on wounded and unwounded fruits, as well as morphological and molecular characterization. The results indicate that the causal agent of the sinking symptoms was *Fusarium sambucinum*. The isolates were planted in PDA, Clavel-Agar, and SNA culture media, where they formed orange sporodochia, hyaline macroconidia with the papillated basal cell and the terminal cell in foot shape: 24.8-35.3 µm long and 3.67-4.46 µm wide, from three to five septa, this was confirmed by the sequencing analysis of the *tef 1α* gene (translation elongation factor 1α). The comparison between means (Tukey) detected significant differences in the method of inoculation but not between isolations on the fruit. This is the first report in Mexico of *Fusarium sambucinum*

se sembraron en medios de cultivo PDA, Clavel-Agar y SNA, en donde formaron esporodoquios de color naranja, macroconidias hialinas con la célula basal papilada y la célula terminal en forma de pie: 24.8-35.3 μm de largo y 3.67-4.46 μm de ancho, de tres a cinco septos, esto fue confirmado con el análisis de secuenciación del gen *tef 1 α* (translation elongation factor 1 α). La comparación entre medias (Tukey) detectó diferencias significativas en el método de inoculación, pero no entre aislamientos sobre el fruto. Es el primer reporte en México de *Fusarium sambucinum* como agente causal de lesiones hundidas con micelio blanquecino en frutos de chile manzano.

Palabras clave: hongos, postcosecha, pudrición chile, fusariosis, PDA y *tef 1 α* .

El chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P) es un producto agrícola con altas posibilidades de comercialización a nivel mundial por su demanda para consumo como verdura, o bien por sus propiedades químicas para la obtención de derivados de capsaicina (Pérez-Grajales *et al.*, 2004). El chile manzano fue introducido en México a principios del siglo XX, es el único tipo de chile que se cultiva entre de 1700 y 2500 m; crece como arbusto grande y puede llegar hasta los 3 metros, el fruto es esférico, verde en estado tierno y se torna rojo, amarillo y naranja al madurar. Las principales zonas productoras de chile manzano se encuentran ubicadas en los estados de Michoacán, Puebla, Edo. de México y Veracruz, en menor escala Chiapas y Oaxaca (Espinosa-Torres y Villa-Galindo, 2008). El período de siembra es en los meses de abril y mayo, el consumo es insustituible para las zonas de la sierra norte de Puebla, Toluca y Michoacán (principalmente Morelia), donde forma parte de los hábitos alimenticios. En cuanto a su cosecha a cielo abierto

as the causal agent of sunken lesions with whitish mycelium in manzano peppers.

Key words: fungi, postharvest, pepper rot, fusariosis, PDA, and *tef 1 α* .

The manzano chili pepper (*Capsicum pubescens* R and P) is an agricultural product with high possibilities of worldwide commercialization due to its demand for consumption as a vegetable or for its chemical properties to obtain sub products of capsaicin (Pérez-Grajales *et al.*, 2004). Manzano peppers were introduced into Mexico at the beginning of the 20th Century, and it is the only type of chili pepper grown between 1700 and 2500 masl; it grows as a large bush, it can reach heights of up to 3 meters, the fruit is spherical and is green until its stage of maturity, when it turns red, yellow and orange. The main production areas of manzano peppers are located in the states of Michoacán, Puebla, the State of Mexico and Veracruz, and to a lower extent, in Chiapas and Oaxaca (Espinosa-Torres and Villa-Galindo, 2008). Its harvesting period is in the months of April and May. Its consumption is irreplaceable for the areas of the Sierra Norte in Puebla, Toluca, and Michoacan (mainly Morelia), where it is a part of people's dietary habits. Its harvest yield in the open is between 9 and 14 t/ha, and in a greenhouse, between 40 and 70 t (Espinosa-Torres and Ramírez-Abarca, 2016). However, the crop can be affected by pathogens. Some of the diseases that affect the crop include wilting of the manzano pepper, caused by diverse pathogens such as *Botrytis*, *Fusarium* spp., and *Phytophthora*, etc., which cause significant losses in production in several parts of the world, including Mexico. *Fusarium sambucinum* [teleomorph *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc (Leslie and Sumerell, 2006)] is one of the fungal species

es de 9 a 14 t/ha e invernadero 40 a 70 t (Espinosa-Torres y Ramírez-Abarca, 2016). Sin embargo, el cultivo puede ser afectado por patógenos. Entre las enfermedades que afectan el cultivo se encuentran la marchitez del chile manzano, causada por diversos fitopatógenos, tales como *Botrytis*, *Fusarium* spp., *Phytophthora*, etc., los cuales ocasionan pérdidas significativas en la producción en varias partes del mundo, incluyendo México. *Fusarium sambucinum* [teleomorfo *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc (Leslie y Sumerell, 2006)] es una de las especies de hongos que causa podredumbre seca o pudrición negra en papa (*Solanum tuberosum* L.), afectando en campo como en almacenamiento (Hanson *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2008). *F. sambucinum* ha sido reportado en Europa, Estados Unidos de América y, recientemente, en China afecta a frutos en almacenamiento y que produce micotoxinas, tales como tricotecenos (El-Banna *et al.*, 1984; Altomare *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2012). La identificación correcta de un fitopatógeno es esencial para proponer las alternativas más efectivas para su manejo (Agrios, 2005). En este contexto, el objetivo, fue determinar el agente causal de lesiones hundidas en frutos de chile manzano por medio de caracterización morfológica y molecular con factor de elongación (EF-1 ∞) y pruebas de patogenicidad en frutos.

En noviembre del 2015 se llevó a cabo un muestreo dirigido a frutos de chile manzano procedentes del Estado de México, municipio de Coatepec de Harinas en donde se colectaron frutos con síntomas de pudrición y lesiones hundidas. Las muestras se trasladaron en bolsas de plástico (Ziploc®) etiquetadas y colocadas en una hielera al laboratorio de postcosecha del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

Para aislar al agente causal, se desinfestaron fragmentos de 1 cm de la zona de avance de la pudrición causada por hongos, para lo cual se realizaron cortes de tejido de 40 frutos y se utilizó una

that cause dry rotting or black rotting in potatoes (*Solanum tuberosum* L.), affecting both in the field or in storage (Hanson *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2008). *F. sambucinum* has been reported in Europe, the United States, and recently, in China, as affecting fruits in storage and producing micotoxins such as trichothecenes (El-Banna *et al.*, 1984; Altomare *et al.*, 1995; Du *et al.*, 2012). The correct identification of a plant pathogen is essential to propose the most effective alternatives for its management (Agrios, 2005). In this context, the aim was to determine the causal agent of sunken lesions in manzano pepper fruits using morphological and molecular characterization with a factor of elongation (EF-1 ∞) and pathogenicity tests in fruits.

In November of 2015, samples were taken of manzano pepper fruits from the municipality of Coatepec de Harinas, State of Mexico, where fruits were gathered with symptoms of rotting and sunken lesions. The samples were placed in labeled plastic bags (Ziploc®) in a cooler and taken to the postharvest laboratory of the Instituto de Fitosanidad of the Colegio de Postgraduados.

To isolate the causal agent, we disinfested 1 cm fragments of the area of advancement of the rotting caused by fungi, and for this, cuts were made on the tissues of 40 fruits and placed them in a sodium hypochlorite solution at 0.2% for 2 min. They were then washed with sterile distilled water twice, left to dry on sterile paper towels and placed in Petri dishes with 20 mL of PDA, which were left in an incubator at 27 $\pm$ 2 °C, under light for 24 h. After sporulating after six days of growth, monosporic cultures were performed and moved to Petri dishes with a PDA culture medium. The conservation of isolations was carried out with the transfer of 10 mycelial discs (5 mm in diameter) to 2 mL cryogenic tubes with 1.5 mL of glycerine at 20% (v/v) stored at -80 °C and in test tubes with mineral oils.

solución de hipoclorito de sodio al 0.2% durante 2 min, enseguida se lavaron con agua destilada estéril dos veces, se dejaron secar sobre sanitas estériles y se colocaron en cajas Petri con 20 mL de PDA. Las cajas se colocaron en incubación a 27 ± 2 °C, bajo un régimen de 24 h luz; una vez esporulados a los seis días de crecimiento, se realizaron cultivos monospóricos y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo PDA. La conservación de los aislados se llevó acabo con la transferencia de 10 discos miceliales (5 mm de diámetro) a tubos crio-génicos de 2 mL, con 1.5 mL de glicerina al 20% (v/v) almacenados a -80 °C y en tubos de ensaye con aceite mineral.

La caracterización morfológica se realizó a partir de sus estructuras de reproducción asexual. Para lo cual los aislados fueron transferidos a medio de cultivo PDA, SNA y Clavel-Agar con tres repeticiones para cada una de las colonias fúngicas, posteriormente fueron incubadas a 25 ± 2 °C en condiciones de luz continua. Se midió el crecimiento micelial cada 48 h hasta que el hongo llenó por completo la caja donde se evaluó el color de la colonia, tipo de micelio, crecimiento del micelio y esporas (conidios, clamidosporas y esporodoquios). Después de 15 días de incubación se hicieron preparaciones en glicerina al 50 % con la finalidad de reconocer las estructuras de los hongos con ayuda de un microscopio compuesto (Velab Ve-B6, México). Se observaron 50 macroconidios y se registró su tamaño, coloración y número de septos con el programa Motic Images plus 2.0 (Group Co., Ltd). La identificación morfológica de los hongos a nivel de género se llevó acabo empleando las claves especializadas de Barnett y Hunter (1998) y para especie de Leslie y Summerell (2006).

Una vez obtenidos los aislados puros de los hongos, se inició la identificación molecular con la extracción de ADN genómico de nueve aislados e identificados morfológicamente como *Fusarium*

The morphological characterization was carried out from their asexual reproduction structures. For this process, the isolations were transferred to PDA, SNA and Clavel-Agar culture mediums with three repetitions for each one of the fungal colonies; they were then incubated at 25 ± 2 °C under conditions of continuous light. The mycelial growth was measured every 48 h until the fungus completely filled the dish, where the color of the colony was evaluated along with the type of mycelium, growth of the mycelium and spores (conidia, chlamydospores and sporodochia). After 15 days of incubation, preparations were made in glycerine at 50% with the purpose of recognizing the structures of the fungi using a compound microscope (Velab Ve-B6, México). Fifty macroconidia were observed and their size, color and number of septa were recorded using the program Motic Images plus 2.0 (Group Co., Ltd). The morphological identification of the fungi at the level of genus was carried out using Barnett and Hunter's specialized code (1998), and for species, Leslie and Summerell's (2006).

Once the pure isolations were taken from the fungi, we began the molecular identification with the extraction of genomic DNA from nine isolations and morphologically identified as *Fusarium*; for this, we followed the protocol indicated in the Plant DNeasy® Minikit extraction kit (Quiagen). A 0.03 g mycelium sample was placed in Eppendorf tubes, tenderizing with a hypodermic needle. We then added 400 µL of Buffer AP1 and 4 µL of RNase y se agitó. The samples were incubated in a double boiler for 10 min at 65 °C, we stirred by inverting them every 2 min, and later added 120 µL of the Buffer AP2 to the sample, and incubated for 5 min in ice. The mixture was placed in the QIAshredder Mini spin column and centrifuged for 2 min at 14000 rpm. The supernatant was then removed and placed in a new Eppendorf tube, to which 675 µL of the Buffer AP3/E were added. The

para lo cual se siguió el protocolo indicado en el kit de extracción Plant DNeasy® Minikit (Quiagen). Se colocó una muestra de micelio de 0.030 g en tubos Eppendorf macerando con aguja hipodérmica. Se adicionaron 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL de RNasa y se agitó. Las muestras fueron incubadas en baño María por 10 min a 65 °C, se agitó por inversión cada 2 min, después se adicionaron a la muestra 120 µL del Buffer AP2, y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 14000 rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo Eppendorf al que se agregaron 675 µL del Buffer AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin centrifugándolo a 8000 rpm por 1 min. La columna fue reemplazada por otra suplementaria del protocolo y se agregaron 500 µL del Buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó a 8000 rpm por un min; nuevamente se cambió la columna con el filtrado, se adicionaron 500 µL del Buffer AW a la membrana y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un nuevo tubo Eppendorf y se agregaron 100 µL del Buffer AE. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Los productos de extracción de ADN se enviaron al laboratorio de MacroGen® Inc. (Corea) para su purificación, amplificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se procesaron en el programa BioEdit v7.0.9. Se realizaron las pruebas de PCR Factor de elongación (EF-1 ∞) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 63 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C (O'Donnell *et al.*, 1998).

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo sobre 80 frutos de chile manzano sanos en estado de madurez fisiológica, los cuales se inocularon con nueve aislados identificados morfológicamente

mixture was placed in a DNeasy Mini spin tube and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. The column was replaced with another supplementary one of the protocol and 500 µL of the Buffer AW were added in the membrane of the Mini spin DNeasy and centrifuged at 8000 rpm for 1 min; the column was changed once again with the filtrate, 500 µL of the Buffer AW were added to the membrane and centrifuged at 14000 rpm for 2 min. Finally, the DNeasy Mini spin column was transferred to a new Eppendorf tube and 100 µL of the Buffer AE were added. It was incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 8000 rpm for 1 min. The DNA extraction products were sent to the MacroGen® Inc. laboratory (Korea) to be purified, amplified, and sequenced. The sequences obtained were processed in the program BioEdit v7.0.9. The PCR Elongation factor (EF-1 ∞) tests were carried out with the following conditions: initial denaturalization for 5 min at 94 °C, 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 63 °C, 1 min at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C (O'Donnell *et al.*, 1998).

The pathogenicity tests were carried out on 80 healthy manzano pepper fruits in a stage of physiological maturity, which were inoculated with nine isolations, identified morphologically as *Fusarium* sp. The fruits were disinfected using a 0.5 % sodium hypochlorite solution for 5 min, they were submerged in sterile distilled water for 10 min and placed on sterilized paper towels (Kimberly-Clark) until completely dry. Four fruits were inoculated and placed in Styrofoam trays with paper towels, moistened with sterile distilled water placed inside plastic, to provide humidity. The trays with the fruits were placed in a growth chamber under incubation conditions of 27 $\pm$ 2 °C. Inoculation was carried out in fruits with lesions (punctured with a needle) and without lesions, and on top of that we placed a disc, 5 mm in diameter, that contained

como *Fusarium* sp. Los frutos se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio 0.5% durante 5 min, se sumergieron en agua destilada estéril durante 10 min y se colocaron sobre toallas de papel (Kimberly-Clark) estériles hasta secarse totalmente. Se inocularon cuatro frutos los cuales se colocaron en charolas de unicel con toallas de papel y humedad con agua destilada estéril que se colocaron dentro de bolsa de plástico para proporcionar humedad. Las charolas con los frutos se colocaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones de incubación de 27 ± 2 °C. La inoculación se hizo en frutos con herida (punción con aguja) y frutos sin herida sobre los cuales se colocó un disco de 5 mm de diámetro que contenían el crecimiento micelial del hongo de cada uno de aislados de siete días de edad. Como testigo se usaron chiles sin herida e inoculados con discos de PDA sin micelio del hongo. Se midió el diámetro de la lesión en los chiles inoculados y sin inocular con los aislados de *Fusarium* sp. cada 48 h. Las pruebas de patogenicidad se repitieron dos veces para cada tratamiento y el testigo. Para información adicional sobre el tamaño de lesión, se realizó comparación de medias (prueba de Tukey) utilizando el programa SAS V.9.1 para Windows.

De la identificación morfológica se obtuvieron nueve aislados del material procesado de los frutos de chile manzano que presentaron un crecimiento promedio de 2 cm de diámetro por día en medio de cultivo PDA. Cada aislado mostró diferente coloración en el medio de cultivo PDA por lo que se formaron tres grupos a los cuales se les asignó una clave. El primer grupo mostró crecimiento micelial de color blanco-rosa que con el paso del tiempo se tornó de color rosa en el medio de cultivo (claves FS24, FS26 y FS27). El segundo grupo mostró crecimiento blanco-crema con crecimiento afelpado, algodonoso y abundante (claves FS25, FS28 y FS32). El tercer grupo presentó un crecimiento

the mycelial growth of the fungus of each one of the seven-day-old isolations. As a control, we used peppers without wounds, inoculated with PDA discs without fungal mycelia. We measured the diameter of the lesions in the inoculated and uninoculated peppers with the isolations of *Fusarium* sp. every 48 h. The pathogenicity tests were carried out twice for each treatment and the control. For additional information on the size of the lesion, we carried out a Tukey comparison of averages using the program SAS V.9.1 for Windows.

From the morphological identification, we obtained nine isolations of the material processed from the manzano chili pepper fruits that showed an average growth rate of 2 cm in diameter in a PDA culture medium. Each isolation displayed different colors in the PDA culture medium, and therefore, three groups were formed, each one of which were given a code. The first group displayed a mycelial growth colored whitish-pink, which turned pink with time in the culture medium (codes FS24, FS26 and FS27). The second group displayed a cream colored white growth, with a fuzzy, abundant cotton-like appearance (codes FS25, FS28 and FS32). The third group presented an initially white growth, which turned red with time (codes FS30, FS31 and FS33). These results coincide with studies reported by Baturo Ciesniewska *et al.* (2015), who observed different pigments in the culture medium, caused by *Fusarium sambucinum*, gathered from *Solanum tuberosum* culture. It was also observed that the nine isolations that grew in the PDA medium formed structures called macroconidia, and in the SNA culture, there was an abundant formation of macroconidia along with orange colored sporodochia. Only fungal mycelia formed in the Clavel-Agar culture medium, and this behavior was general for the nine isolations. Regarding the shape of the macroconidia, they were sickle-shaped hyaline with thin walls, and

inicialmente blanco, pero con el paso del tiempo se tornó de color rojo (claves FS30, FS31 y FS33). Estos resultados coinciden con estudios reportados por Baturó Ciesniewska *et al.* (2015) quienes observaron diferentes pigmentos en el medio de cultivo causados por *Fusarium sambucinum* que se colectó del cultivo de *Solanum tuberosum*. Así mismo se observó que los nueve aislados que crecieron en el medio de cultivo PDA formaron estructuras llamadas macroconidios y en el medio de cultivo SNA se tuvo formación de macroconidios en forma abundante y esporodoquios de color naranja. En el medio de cultivo de Clavel-Agar sólo se desarrolló micelio del hongo, este comportamiento fue en general para los nueve aislados. En cuanto a la forma de los macroconidios estos fueron falcados hialinos con pared delgada y por lo general bastante uniformes en tamaño presentando célula basal papilada y la célula terminal en forma de pie. El promedio del tamaño de los conidios fue 24.8-35.3 μm de largo y 3.67-4.46 μm de ancho, se observaron de tres a cinco septos por conidio (Figura 1), no hubo presencia de microconidios ni formación de clamidosporas, con estas características morfológicas los nueve aislados se identificaron como *Fusarium sambucinum*. Todas las características coincidieron con las descritas por Leslie y Summerell (2006) para *F. sambucinum*. A diferencia de *F. torulosum* y *F. venetatum* que producen clamidosporas, *F. sambucinum* no las produce. En cuanto *F. culmorum* solo se distingue por el marcador molecular con Factor de elongación (EF-1 ∞) que confirmó a *F. sambucinum*.

Las secuencias de los nueve aislados se compararon con las secuencias de las bases de datos del GenBank mostrando un 99 % de identidad con *F. sambucinum* en cadena de la polimerasa con Factor de elongación (EF-1 ∞). Las secuencias consenso se denominó CHF24 y se obtuvo mediante alineación de avance y retroceso de la secuencia, y fue

generally uniform in size, presenting a papillary basal cell in the shape of a foot. The average size of the conidia was 24.8-35.3 μm in length and 3.67-4.46 μm in width; three to five septa were found per conidium (Figure 1), there was no microconidia or formation of chlamydospores. With these morphological characteristics, the nine isolations were identified as *Fusarium sambucinum*. All characteristics coincided with those described by Leslie and Summerell (2006) for *F. sambucinum*. Unlike *F. torulosum* and *F. venetatum*, which produce chlamydospores, *F. sambucinum* does not. *F. culmorum* can only be distinguished for the molecular marker with a Factor of elongation (EF-1 ∞) which confirmed *F. sambucinum*.

The sequences of the nine isolations were compared with the sequences from the GenBank database, showing a 99% identity with *F. sambucinum* in chain with the polymerase with a Factor of elongation (EF-1 ∞). The consensus sequence was named CHF24 and it was obtained by aligning the progress and regression of the sequence, and it was deposited in the Gen Bank with accession number (KX632088.1). This confirmed the results of the morphological characterization.

The nine *F. sambucinum* isolations used to inoculate the manzano chilli pepper fruits were 100% pathogenic; in the treatments without lesions, only 20% of the inoculated fruits presented symptoms, whereas the control pepper fruits were asymptomatic. In pepper fruits with lesions, we noticed sunken circular lesions 96 h after inoculation (hai); also, surface mycelia developed at 144 hai and sporulation of conidia 192 hai (Figure 2). The pathogenic fungus was re-isolated from the manzano pepper fruits infected with each isolation of *F. sambucinum*, to confirm Koch's postulates; the same morphological growth characteristics were observed for the fungus, both in the re-isolations and in the original inoculations.

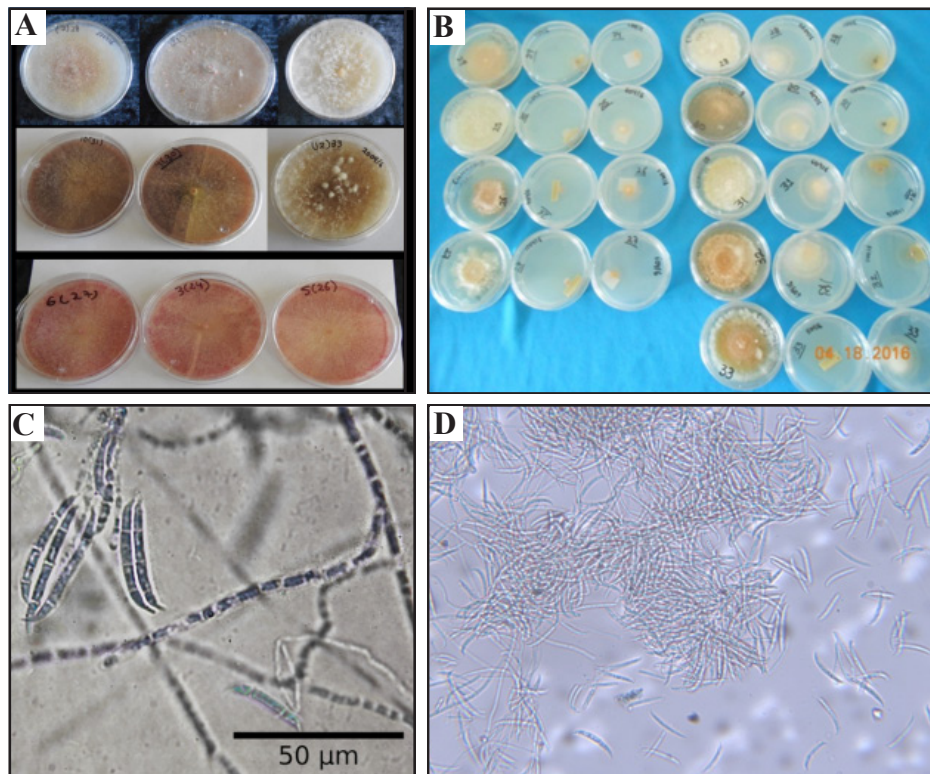


Figura 1. Caracterización cultural y morfológica de *F. sambucinum* (A). Colonias en medio de PDA de ocho días de edad. (B) Macroconidios de siete días de edad producidos en medio PDA 40X. (C) Crecimiento de colonias en medio de cultivo SNA y Clavel-Agar. (D) Esporodochios producidos en medio SNA 10 X.

Figure 1. Cultural and morphological characterization of *F. sambucinum* (A). Cultures in eight-day-old PDA medium. (B) Seven-day-old macroconidia produced in a PDA 40X medium. (C) Culture growth in cultures in SNA and Clavel-Agar culture media. (D) Sporodochia produced in SNA 10 X medium.

depositada en Gen Bank con el número de accesión (KX632088.1). Lo anterior confirmó los resultados de la caracterización morfológica.

Los nueve aislados de *F. sambucinum* que se utilizaron para inocular los frutos de chile manzano con heridas fueron patogénicos en un 100%, en los tratamientos sin herida solo el 20% de los frutos inoculados presentaron síntomas, mientras que los frutos de chile testigos fueron asintomáticos. En frutos de chile con herida, se observaron lesiones circulares hundidas a las 96 h después de la inoculación (hdi), además se desarrolló micelio superficial a las 144 hdi y esporulación de conidios de a las 192 hdi (Figura 2). El hongo fitopatógico

In the comparison of averages of the treatments with lesions, no significant differences were observed between the diameter of the lesion in the nine isolations evaluated ($p > 0.05$) (Table 1).

This study observed that the nine *F. sambucinum* isolations are pathogenic. Regarding the two inoculation methods with and without lesions, we observed that in the first method 100% of the fruits inoculated displayed symptoms such as circular lesions, sunken with a milky white mycelium and fungal sporulation; meanwhile, in the pepper fruits inoculated without lesions, we observed that only 20% presented the characteristic symptoms mentioned above in manzano peppers. These

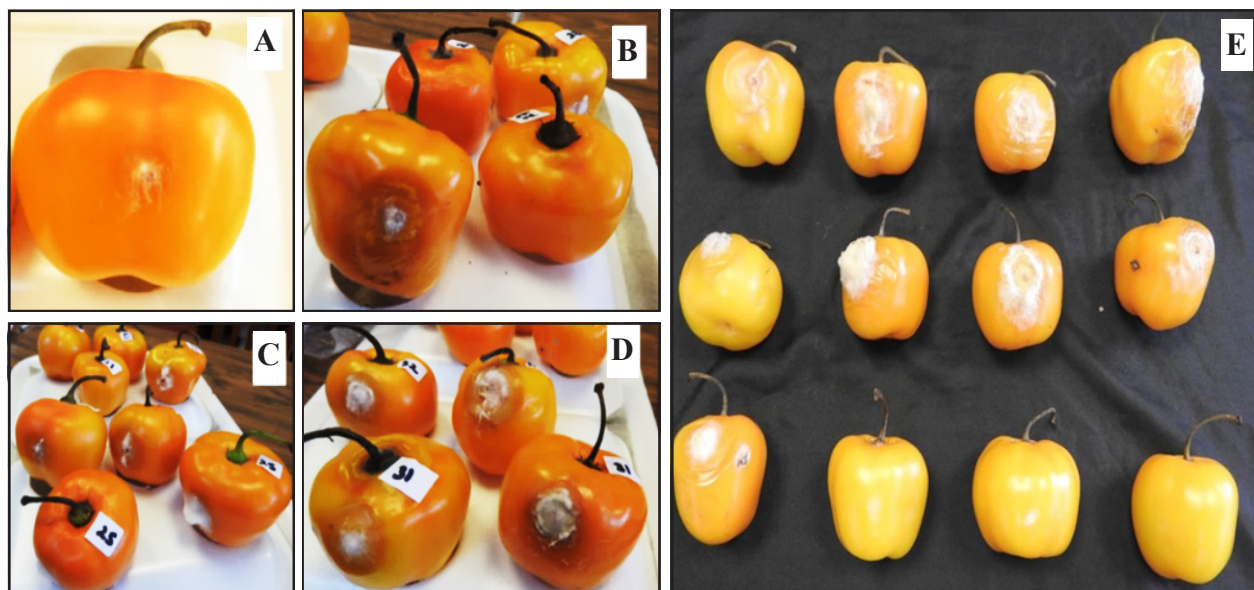


Figura 2. Síntomas de hundimiento observados a las 96 hdi en frutos de chile manzano inoculados con discos de *F. sambucinum* (A). Presencia de micelio blanquecino a las 144 hdi (B y C). Presencia de esporulación de conidias a los 192 hdi estos fueron con herida (D). Micelio y esporulación de *F. sambucinum* en frutos con herida artificial (192 hdi) (E).

Figure 2. Symptoms of sinking observed 96 hai in manzano chili peppers inoculated with *F. sambucinum* discs (A). Presence of cloudy white mycelium at 144 hai (B and C). Presence of sporulation of conidia at 192 hai; these were with lesions (D). Micelia and sporulation of *F. sambucinum* in fruits with artificial lesions (192 hai) (E).

se reaisló a partir de los frutos de chile manzano infectados con cada aislado de *F. sambucinum*, para confirmar los postulados de Koch; se observaron las mismas características morfológicas de crecimiento del hongo tanto en los reaislamientos como en las inoculaciones originales. En la comparación de medias de los tratamientos con herida no se observaron diferencias significativas entre el diámetro de la lesión en los nueve aislados evaluados ($p > 0.05$) (Cuadro 1).

En este estudio se observó que los nueve aislados de *F. sambucinum* resultaron patogénicos. En cuanto a los dos métodos de inoculación con herida y sin herida se observó que en el primer método el 100% de los frutos inoculados presentaron síntomas

Cuadro 1. Diámetro de lesión inducido por de *F. sambucinum* en frutos de chile manzano con heridas artificiales.

Table 1. Diameter of lesion induced by *F. sambucinum* in manzano pepper fruits with artificial lesions.

Aislados	Diámetro de la lesión (mm)
FS24	18.05a ^z
FS25	18.85 a
FS26	16.98 a
FS27	12.03 a
FS28	14.96 a
FS30	14.81 a
FS31	17.19 a
FS32	21.07 a
FS33	14.32 a

^zValores con la misma letra, dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$) / Values with the same letter within the column are statistically equal (Tukey, $\alpha=0.05$).

como lesiones circulares, hundidas con micelio blanquecino y esporulación del hongo; mientras que, en los frutos de chile inoculados sin herida se observó que solo 20% presentaron los síntomas característicos mencionados con anterioridad en frutos de chile manzano. Estos resultados fueron similares a los reportados por otros autores (Nelson *et al.*, 1981; Secor y Salas, 2001; Peters *et al.*, 2008; Gachango *et al.*, 2012; Baturo-Ciesniewska *et al.*, 2015) quienes encontraron que el patógeno causa podredumbre seca en tubérculos de *Solanum tuberosum* con heridas artificiales.

Además, se observó que los nueve aislados cultivados en PDA formaron tres grupos de color de micelio de los cuales dos grupos coinciden con los reportados por Baturo-Ciesniewska *et al.* (2015) quienes agruparon los aislados en color rosa, salmón y crema brillante. Para este estudio se presentaron colonias con una coloración blanco cremoso, rosa y rojiza marrón.

En cuanto a las características morfológicas se observó que los aislados de *F. sambucinum* cultivados en PDA formaron macroconidios y en SNA formaron abundantes esporodoquios y macroconidios con coloración naranja, no hubo presencia de microconidios ni formación de clamidosporas dichas características coinciden con las reportadas por Leslie y Summerell (2006).

Las secuencias obtenidas a partir del DNA de los nueve aislados mostraron similitud del 99% con otras secuencias de *F. sambucinum*, en la base de datos del Gen Bank con número de acceso KP710620 y KP674193 las cuales se reportaron como agente causal de la podredumbre seca en tubérculos de papa (Stefancyk *et al.*, 2016). En esta investigación todos los aislados se identificaron como *F. sambucinum* y una de las secuencias consenso realizadas (número de acceso KX632088.1) se depositó en Gen Bank; sin embargo, es necesario

resultos were similar to those reported by other authors (Nelson *et al.*, 1981; Secor and Salas, 2001; Peters *et al.*, 2008; Gachango *et al.*, 2012; Baturo-Ciesniewska *et al.*, 2015), who found that the pathogen causes dry rotting in *Solanum tuberosum* tubers with artificial lesions.

In addition, we observed that the nine isolations grown in PDA formed three groups of mycelium colors, out of which two groups coincide with those reported by Baturo-Ciesniewska *et al.* (2015), who grouped the isolations into the colors pink, salmon and bright cream. For this study, cultures were presented colored creamy white, pink and reddish maroon.

Regarding morphological characteristics, we observed that the *F. sambucinum* isolations planted in PDA formed macroconidia, and in SNA, they formed abundant sporodochia and orange-colored macroconidia. No microconidia were present, nor were there chlamydospores; these characteristics coincide with those reported by Leslie and Summerell (2006).

The sequences obtained from the DNA of the nine isolations displayed a 99% similarity with other *F. sambucinum* sequences in the Gen Bank database, with accession number KP710620 and KP674193, which were reported as the causal agent of dry rotting in potato tubers (Stefancyk *et al.*, 2016). In this investigation, all isolations were identified as *F. sambucinum* and one of the sequences carried out (accession number KX632088.1) was deposited in the Gen Bank; however, it is necessary to take samples from different areas of the country in which manzano chilli peppers are grown, in order to know the distribution of the pathogen in Mexico.

In conclusion, the results of this work show that morphological identification, molecular characterization and pathogenicity tests on the causal agent of the symptoms of sunken lesions

realizar un muestreo en distintas regiones del país en donde se cultiva chile manzano para conocer la distribución del patógeno en México.

En conclusión se tiene que los resultados del presente trabajo, de muestran que la identificación morfológica, caracterización molecular y pruebas de patogenicidad del agente causal de los síntomas de lesiones hundidas con micelio blanquecino en el fruto de chile manzano es *Fusarium sambucinum* y las heridas favorecen la penetración del patógeno en postcosecha.

Este es el primer estudio que se realiza en México de *Fusarium sambucinum* en frutos de chile manzano en postcosecha.

LITERATURA CITADA

- Agrios N. 2005. Plant Pathology. 5th edn. San Diego, California. USA. Elsevier Academic Press. 922p.
- Altomare CA, Logrieco A, Bottalico GM, Moretti and Evidente A 1995. Production of type A trichothecenes and enniatin B by *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato. Mycopathology 129:177-181 Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F01103344.pdf>
- Barnett LH and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Baturo-Ciesniewska A, Lenc L, Grabowski A and Lukanowski A. 2015. Characteristics of Polish isolates of *Fusarium sambucinum*: Molecular identification, pathogenicity, diversity and reaction to control agents. American Journal of Potato 92: 49-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-014-9410-z>
- Du M, Ren, X, Sun Q, Wang Y and Zhang R. 2012. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. Potato Research, 55:175-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s11540-012-9217-6>
- El-Banna AA, Scott PM, Lau PY, Sakuma T, Platt HW and Campbell V. 1984. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. Appl. Environ. Microbiol. 47:1169-1171 Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC240098/pdf/aem00162-0289.pdf>
- Espinosa-Torres, LE y Villa-Galindo, A. 2008. Regiones productoras de chile manzano. Rev. Ext. Campo. 7-8: 8-12
- Espinosa-Torres LE, y Ramírez-AO. 2016. Rentabilidad de chile manzo (*Capsicum pubescens* R&P) producido en invernadero en Texcoco, Estado de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(2):325-335 Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v7n2/2007-0934-remexca-7-02-00325.pdf>
- Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao J J and Kirk WW. 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. Plant Disease, 96:1767-1774. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0932-RE>
- Hanson LE, Schwager SJ and Loria R. 1996. Sensitivity to thiabendazole in *Fusarium* species associated with dry rot of potato. Phytopathology, 86:378-384. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-86-378>
- Leslie JF, and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. United States of America; Blackwell Publishing, Oxford, UK. p 388.
- Nelson PE, Toussoun TA, and Cook, RJ. 1981. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy. USA: The Pennsylvania State University Press. 474 p.
- O'Donnell K, Kistler CK, Cigelnik E and Ploetz R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Corcordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:2044-2049 Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19243/pdf/pq002044.pdf>
- Pérez-Grajales M, González-Hernández VA, Mendoza-Castillo MC and Peña-Valdivia C 2004. Physiological characterization of Manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R and P) Landraces. J. Amer. Soc. Hort. 129(1):88-92 Disponible en línea: <http://journal.ashspublishings.org/content/129/1/88.full.pdf+html>
- Peters RD, MacLeod C, Seifert KA, Martin RA, Hale LR, Grau CR, and MacInnis S. 2008. Pathogenicity to potato tubers of *Fusarium* spp. isolated from potato, cereal and forage crops. American Journal of Potato Research, 85(5):367-374. <http://dx.doi.org/10.1007/s12230-008-9037-z>
- SAS Versión .9.1 for Windows
- Secor GA, and Salas B. 2001. *Fusarium* dry rot and *Fusarium* wilt. In: Stevenson WR, Loria GDF, and Weingartner DP (eds). Compendium of potato diseases, 2nd ed., St. Paul, MN, USA: APS Press. 23-25 pp.
- Stefanczyk E, Sobkowiak S, Brylinska M, and Sliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. European Journal Plant Pathol. 145(4): 871-884. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-0875-0>

~~~~~ End of the English version ~~~~~